



Functional roles of Rho-GEF Solo in regulation of actin and intermediate filament networks and mechanotransduction

著者	藤原 佐知子
号	13
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第307号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61360

ふじわら さちこ

氏名（本籍地） 藤原 佐知子

学位の種類 博士（生命科学）

学位記番号 生博第307号

学位授与年月日 平成27年9月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科，専攻 東北大学大学院生命科学研究科
（博士課程）分子生命科学専攻

論文題目 Functional roles of Rho-GEF Solo in regulation of actin and
intermediate filament networks and mechanotransduction
（Rho-GEF Solo によるアクチン繊維と中間径フィラメントの制御と
メカノセンシングにおける機能）

博士論文審査委員 （主査） 教授 水野 健作
教授 福田 光則
教授 小椋 利彦

All the cells in our body are exposed to mechanical forces. The mechanical force-induced cytoskeletal reorganization is essential for numerous pathophysiological processes, such as tissue morphogenesis and homeostasis. Mechanotransduction is a process that cells respond to external forces by converting mechanical force signals to biochemical signals. Epithelial cells perceive external forces primarily through cell-cell and cell-substrate adhesion sites, resulting in reinforcement of actin and intermediate filament (IF) networks. Rho family GTPases are activated by Rho-guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs) and essential for actin reorganization. However, the mechanisms underlying the regulation of force-induced Rho activation remain elusive.

Cyclic stretch is an artificial model of mechanical force loading, which induces the reorientation of vascular endothelial cells (ECs) and their actin stress fibers in a direction perpendicular to the stretch axis. Abiko et al. conducted a screen of short hairpin RNAs targeting 63 Rho-GEFs and demonstrated that at least 11 Rho-GEFs (Abr, Alsln, ARHGEF10, Bcr, GEF-H1, LARG, p190RhoGEF, PLEKHG1, P-REX2, Solo and α -PIX)

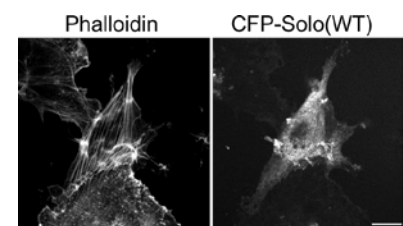


Figure 1. Solo induces F-actin accumulation at cell-cell and cell-substrate adhesion sites in vascular endothelial cells. Scale bar, 20 μ m.

are involved in the stretch-induced perpendicular reorientation of ECs. Among these Rho-GEFs, I examined the role of Solo (the GEF for RhoA and RhoC) in cyclic-stretch-induced responses of ECs. Expression of Solo induced RhoA activation and F-actin accumulation at cell-cell and cell-substrate adhesion sites (Figure 1). I showed that knockdown of Solo significantly suppressed cyclic-stretch-induced perpendicular reorientation of ECs, when cells were cultured at drug-free control conditions, but the suppressive effect of Solo knockdown was not detected when cells were pretreated with EGTA or VE-cadherin- targeting siRNAs (Figure 2). I also showed that knockdown of Solo suppressed force-induced RhoA activation by biochemical analyses (Figure 3).

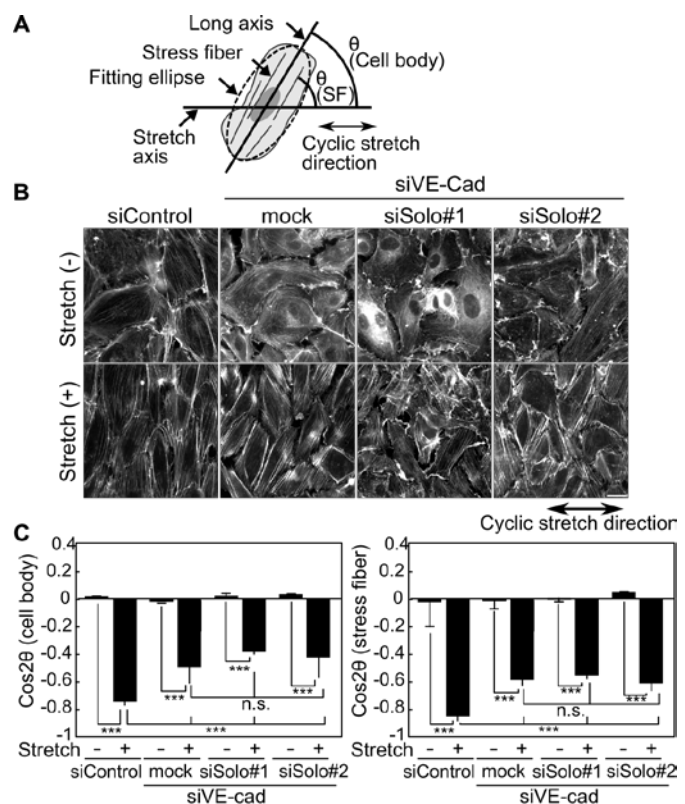


Figure 2. Knockdown of VE-cadherin abrogates the suppressive effect of Solo knockdown on cyclic-stretch-induced cell and SF orientation. (A) Analysis of SF and cell body orientation. The angle (θ) relative to the stretch axis was measured. (B) Effects of VE-cadherin knockdown on cyclic-stretch-induced cell and SF orientation. (C) The orientation parameters ($\cos 2\theta$) of cell bodies (left) and SFs (right) were measured. The values of $\cos 2\theta=0$ and -1 indicate the random and perpendicular orientation, respectively. Scale bar, 20 μ m.

These results suggest that Solo is involved in cell-cell-contact- and VE-cadherin-mediated mechanical signal transduction during cyclic-stretch-induced cell and stress fiber reorientation of ECs.

IFs are stable but resilient cytoskeletal filaments that provide structural support for cells. Keratins are major IFs in epithelia. I examined the interaction between keratin IFs and Solo. Solo binds to keratins-8/keratin-18 (K8/K18) IFs through multiple sites. Solo overexpression in epithelial cells promoted the formation of thick stress fibers and keratin bundles, whereas knockdown of Solo or expression of a GEF-inactive mutant of Solo suppressed stress fiber formation and led to disorganized keratin networks. To examine the roles of Solo and keratin IFs

in mechanotransduction, I developed the time-lapse observation system of tensional-force-induced stress fiber formation. I showed that knockdown of Solo or K18 or overexpression of GEF-inactive or deletion mutants of Solo suppressed tensile-force-induced stress fiber formation. These results suggest that the interplay between Solo and K8/K18 filaments plays a crucial role in tensile-force-induced RhoA activation and consequent actin cytoskeletal reinforcement.

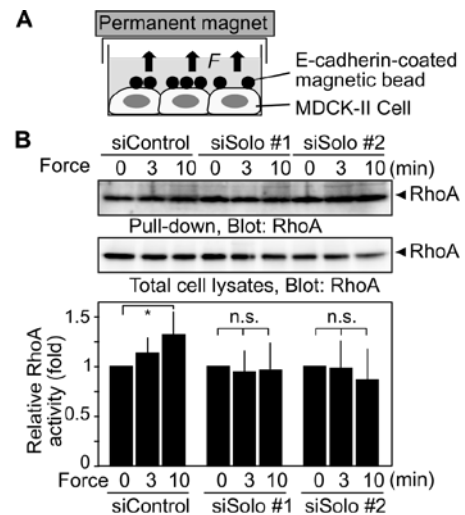


Figure 3. Solo is required for tensile-force-induced RhoA activation. (A) Scheme of the process of tensile force application. (B) Intracellular RhoA activity was analyzed by GST-rhotekin(RBD) pull-down assays. Knockdown of Solo suppresses tensile-force-induced RhoA activation.

Publication

Abiko, H.[†], Fujiwara, S.[†], Ohashi, K., Hiattari, R., Mashiko, T., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K. (2015). Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 128, 1683–1695. ([†]co-first authors)

論文審査結果の要旨

力学的刺激に対する細胞応答は生体の恒常性維持や生理機能の制御に重要である。力学的刺激は主に細胞間接着あるいは細胞-基質間接着部位で受容され、化学的シグナルに変換された後、アクチンや中間径フィラメントなどの細胞骨格の再構築を誘導する。低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーはアクチン骨格の再構築に必須のシグナル分子であり、Rho-グアニンヌクレオチド交換因子 (Rho-GEF) により活性化される。しかしながら、力学的刺激による Rho シグナルの活性制御機構は不明である。血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞の伸展方向とは直交方向への配向に必要な Rho-GEF として 11 種類の Rho-GEF が同定された。本研究では、11 種類の Rho-GEF のうち Solo (ARHGEF40) に着目し、Solo が細胞間接着部位や細胞-基質間接着部位に局在すること、繰返し伸展刺激による細胞配向において細胞間接着依存的な細胞配向に関与すること、引張刺激による RhoA の活性化に関与することを明らかにした。さらに、Solo は上皮細胞の主要な中間径フィラメントであるケラチン-8/18 と複数箇所では結合することを明らかにした。Solo を上皮細胞に過剰発現させると、太いストレスファイバーと太いケラチン繊維の形成が促進された一方で、Solo の発現抑制はストレスファイバーの消失とケラチン繊維の不規則な分布を引き起こした。細胞の力覚応答における Solo およびケラチン繊維の役割を解明するために、引張刺激依存的なストレスファイバー形成をリアルタイムで可視化解析できる引張力負荷試験系を構築した。Solo の GEF 不活性型変異体やケラチン結合領域の過剰発現や、Solo やケラチン-18 の発現抑制は、引張刺激依存的なストレスファイバー形成を抑制した。さらに、Solo やケラチン-18 の発現抑制は、引張刺激依存的な RhoA の活性化を抑制した。以上の結果から、Solo はケラチン繊維との結合を介して、力学的刺激依存的な RhoA の活性化に関与し、アクチン繊維とケラチン繊維の再構築に寄与することが明らかとなった。以上の成果は、細胞の力覚応答機構を理解する上で重要な成果であり、本論文は、著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、藤原佐知子提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。